

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi, Progam Studi Farmasi S-1 Universitas Bhamada Slawi pada bulan Januari hingga Maret tahun 2025.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan antara lain *blender* (Philips), timbangan analitik (Ohaus), bejana maserasi, *waterbath* (DFS), alat-alat gelas seperti gelas beaker (*pyrex*), gelas ukur (*pyrex*), erlenmeyer (*pyrex*), tabung reaksi (*pyrex*), corong kaca (*pyrex*), corong pisah (*pyre,x*), cawan penguap, labu takar (*pyrex*), *rotary evaporator* (IKA), *moisture analyzer balance* (Ohaus), batang pengaduk, pipet tetes, mikropipet, lampu (Philips), botol bekas air mineral, selang, pompa udara/aerator dan seperangkat alat pengujian larva udang (wadah khusus dari *cup* plastik).

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan adalah rimpang temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume), larva *Artemia salina* Leach, etanol 96% (kimia jaya labora), n-heksan (anugrah visi cemerlang), Etil asetat (anugrah visi cemerlang), Metanol (anugrah visi cemerlang), HCl 2N (kimia jaya labora), aquadest (brataco), FeCl₃ (kimia jaya labora), pereaksi wagner (kimia jaya labora), pereaksi liebermann-burchard (kimia jaya labora), asam asetat

anhidrat (kimia jaya labora), kloroform (kimia jaya labora), H_2SO_4 (kimia jaya labora), DMSO (supelco), garam, soda kue, stik pH, *aluminium foil*, kertas saring dan kain flanel.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimen laboratorium sederhana dengan desain *post-test only control group*, di mana pengukuran dilakukan hanya pada waktu tertentu setelah pemberian perlakuan kepada hewan uji. Perlakuan yang diberikan berupa fraksi temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blumae) pada larva *Artemia salina* Leach. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen untuk menilai toksisitas fraksi temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume), dengan variabel-variabel sebagai berikut:

1. Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi Fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi metanol temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume).

2. Variable Terikat (*Dependent Variable*)

Variabel terikat merupakan variabel akibat karena adanya variabel bebas. Variabel terikat pada penelitian ini yaitu nilai atau tingkat kematian larva udang *Artemia salina* Leach.

3. Variable Terkontrol

Variabel terkontrol merupakan variabel yang konstan sehingga tidak dapat mempengaruhi variabel yang akan diteliti. Pada penelitian ini variabel

terkontrolnya yaitu suhu air, pH air, pencahayaan, waktu pemaparan, stabilitas larutan uji dan metode uji toksisitas serta kondisi larva udang *Artemia salina* Leach.

3.4 Prosedur Penelitian

Pada penelitian uji toksisitas fraksi n-heksan, etil asetat, dan metanol temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) terhadap Larva udang (*Artemia salina* Leach) meliputi:

3.4.1 Determinasi Tanaman

Pemeriksaan atau determinasi tanaman Blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Farmasi Prodi S1 Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Bhamada Slawi.

3.4.2 Pembuatan Serbuk Simplisia

Rimpang temu blenyeh yang digunakan sebanyak 5 kg berat kotor kemudian dilakukan sortasi. Setelah dilakukan sortasi, temu blenyeh dicuci dengan air bersih untuk membersihkan rimpang temu blenyeh dari kotoran yang menempel. Selanjutnya dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 150 menit hingga kering sempurna. Temu blenyeh yang telah kering kemudian diserbuk menggunakan blender (Maria *et al.* 2018).

3.4.3 Pembuatan Ekstraksi dan Fraksinasi

1. Pembuatan Ekstrak Metode Maserasi

Ekstraksi temu blenyeh dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% yang dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Farmasi, Universitas Bhamada Slawi. Untuk perlakuan yang pertama

di timbang simplisia yang sudah halus sebanyak 300 gram. Simplisia dimaserasi dalam etanol 96% dengan perbandingan 1 : 5 (b/v) selama 24 jam sesekali dilakukan pengadukan (Sinaga, 2018). Hasil maserasi disaring menggunakan *corong buchner*. Residu dimaserasi kembali atau remaserasi dengan cairan penyarinya yang sama seperti cairan sebelumnya sampai 2x remaserasi, kemudian filtrat dikumpulkan dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak etanol kental (Maria *et al*, 2018; Zulfiah *et al.*, 2020). Hasil berupa filtrat di uapkan menggunakan Water Bath dengan suhu 60°C, yang bertujuan sebagai penguap pelarut etanol pada filtrat hingga diperoleh ekstrak yang kental etanol 96% rimpang temu blenyeh. Ekstrak kental yang didapatkan ditimbang berat bersihnya, kemudian dilakukan perhitungan persen rendemen dengan rumus menurut (Mangirang dkk, 2019; Togelang *et al*, 2023).

$$\% \text{ rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak yang didapat (g)}}{\text{bobot sampel yang diekstrak (g)}} \times 100\%$$

2. Pembuatan Fraksinasi (Ekstraksi Cair-cair)

Ekstrak etanol 96% rimpang temu blenyeh yang telah didapatkan, kemudian dilakukan proses fraksinasi menggunakan 3 pelarut yaitu pelarut n-heksana, etil asetat, dan metanol dengan perbandingan ekstrak dan pelarut sebesar 1:10 (Peratiwi dkk, 2023).

Fraksinasi dilakukan dengan metode cair-cair yang dilakukan secara bertingkat menggunakan berbagai pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda dengan menggunakan corong pisah. Fraksinasi diawali dengan pelarut non polar (n-heksan), langkah awal yaitu ekstrak kental etanol 96% rimpang temu blenyeh 15 gram dimasukkan ke dalam beaker glass dilarutkan dalam 150 mL air:Etanol (1:4) kemudian dimasukan kedalam corong pisah dan ditambahkan pelarut n-heksan 150 mL (1:1). Corong pisah dikocok dengan hati-hati selama ± 5 menit, sesekali keran corong pisah dibuka. Corong pisah didiamkan hingga terdapat dua lapisan antara ekstrak etanol temu blenyeh dan n-heksan. Lapisan n-heksan di bagian atas dan lapisan ekstrak etanol temu blenyeh di bagian bawah. Keran corong pisah dibuka untuk memisahkan kedua lapisan. Lapisan atas dikumpulkan dan lapisan bawah dimasukkan kembali kedalam corong pisah untuk difraksinasi kembali dengan melakukan langkah yang sama sebanyak 3x atau sampai lapisan n-heksan bening. Fraksi n-heksan dikumpulkan lalu dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40 °C kecepatan 50 hingga diperoleh fraksi kental n-heksan (Hikmah, 2012; Marfuah *et al*, 2019; Mona *et al*, 2022).

Fraksinasi dilanjutkan dengan pelarut semi polar (etil asetat). Residu ekstrak kental etanol 96% rimpang temu blenyeh dipartisi dengan 150 mL pelarut etil asetat. Corong pisah dikocok dengan hati-

hati selama ± 5 menit dan sesekali keran corong pisah dibuka, kemudian corong pisah didiamkan hingga terdapat lapisan antara lapisan etil asetat di atas dan residu ekstrak etanol 96% di bawah. Fraksinasi dilakukan kembali sampai lapisan etil asetat bening atau sebanyak 3x. Fraksi etil asetat dikumpulkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ kecepatan 50 hingga didapatkan fraksi kental etil asetat (Hikmah, 2012; Marfuah *et al*, 2019; Mona *et al*, 2022)

Selanjutnya proses yang sama diulangi dengan pelarut polar (metanol). Sisa residu ekstrak kental etanol 96% rimpang temu blenyeh di partisi lagi dengan ditambahkan 150 mL pelarut metanol Selanjutnya dilakukan langkah seperti n-heksan dan etil asetat kemudian setelah bening dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ kecepatan 50 hingga didapatkan fraksi kental metanol (Hikmah, 2012; Marfuah *et al*, 2019; Mona *et al*, 2022)

3.4.4 Skrining Fitokimia

Analisis kuantitatif dalam skrining fitokimia dilakukan terhadap senyawa metabolit sekunder. Metode yang digunakan untuk mengidentifikasi metabolit sekunder dalam ekstrak etanol 96% dan fraksi n-heksan, etil asetat dan metanol sebagai berikut:

1. Uji Flavonoid

Dimasukkan sampel ekstrak etanol 96%, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi metanol temu blenyeh sebanyak 0,5 gram

kemudian ditambahkan pereaksi H_2SO_4 dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, setelah itu ditambahkan beberapa tetes larutan asam sulfat pekat H_2SO_4 . Diamati pergantian warna yang berlangsung bila larutan berganti warna jadi merah tua ataupun kuning menunjukkan terdapatnya senyawa flavonoid (Shaikh & Patil, 2020).

2. Uji Alkoloid

Sebanyak 0,05 gram sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian dilakukan penambahan H_2SO_4 lalu dilakukan pengocokan sampai benar-benar tercampur. Setelah itu disaring serta dilakukan penambahan pereaksi Meyer akan terbentuk endapan cokelat (Shaikh & Patil, 2020).

3. Uji Saponin

Sebanyak 0,05 gram sampel diletakan dalam tabung reaksi. Setelah itu ditambahkan air panas, dan tabung reaksi dikocok. Diamkan selama 30 menit serta tambahkan HCl 2 N sebanyak 1 tetes. Hasil positif uji saponin ditunjukkan dengan terdapatnya busa yang stabil (Shaikh & Patil, 2020).

4. Uji Tanin

Pengujian tanin dimulai dengan penyiapan sampel sebanyak 0,05 gram sampel setelah itu ditambahkan FeCl_3 serta dihomogenkan. Sampel positif memiliki tanin bila terbentuk warna hijau kehitaman ataupun biru kehitaman (Shaikh & Patil, 2020).

5. Uji Steroid dan Triterpenoid

Pengujian steroid dengan pereaksi Liebermann-Burchard dimulai dengan penyiapan sampel fraksi n-heksan, etil asetat dan metanol temu blenyeh sebanyak 0,05 gram sampel dilarutkan dalam 2 mL kloroform pada tabung reaksi kering. Larutan tersebut ditambahkan 10 tetes anhidrat asetat. Sampel positif memiliki steroid bila tercipta warna biru ataupun jingga. Sampel positif memiliki triterpenoid bila terbentuk warna ungu serta jingga (Shaikh & Patil, 2020).

6. Minyak atsiri

Pengujian kandungan minyak atsiri pada ekstrak dan masing-masing fraksi rimpang temu blenyeh dilakukan dengan menambahkan etanol 96%, kemudian dilarutkan dan diuapkan. Keberadaan minyak atsiri ditandai dengan residu yang masih memiliki aroma khas setelah proses penguapan (Rukmini, 2020)

3.4.5 Uji toksisitas dengan metode BSLT

a. Pemilihan telur *Artemia salina* Leach

Dilakukan dengan merendam telur dalam aquadest selama 1 jam, telur yang memiliki kualitas baik akan mengendap, sedangkan telur yang kurang baik akan mengapung (Slamet *et al*, 2020).

b. Penetasan *Artemia salina* Leach

Telur udang ditetaskan dua hari sebelum pengujian dimulai. Proses penetasan larva *Artemia salina* Leach berlangsung selama 48

jam. Telur tersebut direndam dalam air laut buatan yang terdiri dari 20 gram garam non-iodium (garam ikan) yang dilarutkan dalam mL aquadest dengan pH 7-9, menyerupai kondisi air laut alami. Penetasan dilakukan dalam wadah botol plastik ukuran 1 L yang bagian bawahnya dipotong sehingga membentuk kerucut, menggantikan akuarium. Sebelumnya, botol plastik tersebut dipasang aerator untuk menjaga kadar oksigen dalam air (Rizqillah, 2013). Selanjutnya dimasukan telur 50-100 mg telur udang untuk ditetaskan dan tutup dengan alumunium foil. Wadah yang sudah berisi telur dan dilengkapi aerator diletakkan di tempat yang cukup terang atau diberi penerangan dengan nyalakan lampu neon 5 watt selama 24-48 jam untuk mempertahankan suhu penetasan antara 25-30°C, yang juga merangsang proses penetasan. Cahaya ini mendukung pertumbuhan larva *Artemia salina* Leach. Setelah 48 jam, telur akan menetas menjadi larva, siap digunakan sebagai hewan uji untuk uji toksisitas. Digunakan hewan uji larva *Artemia salina* Leach yang berusia 48 jam dikarenakan memiliki saluran pencernaan yang sudah terbentuk lengkap sehingga sensitif terhadap suatu zat yang dimasukkan dan larva *Artemia salina* Leach identik dengan sel kanker yang membelah secara mitosis (Abasa *et al*, 2023; Budiman & Hidayat, 2021).

c. Persiapan larutan uji

Ekstrak kental, fraksi n-heksan, etil asetat, dan metanol rimpang temu blenyeh yang akan diuji, ditimbang sebanyak 100 mg kemudian dilarutkan dengan DMSO 5% 1-3 tetes untuk melarutkan fraksi lalu ditambahkan hingga 100 mL air laut buatan sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm yang akan digunakan sebagai larutan induk. Sampel yang akan diuji disiapkan pada konsentrasi 100; 80; 60; 40; 20 ppm (Sukmawati, 2019). Setiap konsentrasi larutan dibuat 25 mL, dengan mengambil dari larutan induk pada masing-masing konsentrasi yang sudah dihitung dengan rumus pengenceran, kemudian ditambah air laut buatan sampai batas miniskus. dilakukan secara triplo atau dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali, tiap wadah berisi larutan uji masing-masing sebanyak 25 mL (Abasa et al, 2023).

Rumus Pengenceran : $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$

Keterangan :

V1 : Volume awal

M1 : Konsentrasi awal

V2 : Volume akhir

M2 : Konsentrasi akhir

d. Pelaksanaan uji toksisitas

Uji bioaktivitas dilakukan dengan memasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* Leach yang berumur 48 jam ke dalam botol yang telah berisi larutan ekstrak dan air laut. Untuk setiap konsentrasi

dilakukan 3 kali pengulangan (triplo). Sebagai kontrol adalah air laut yang tidak diberi ekstrak sampel. Botol percobaan disimpan di bawah pencahayaan lampu. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam. Jumlah larva udang yang mati dicatat kemudian dihitung persentase kematiannya (Kaban dkk, 2016). Perhitungan dilakukan dengan mencatat jumlah larva *Artemia salina leach* yang mati pada jam ke-24 untuk setiap konsentrasi. Data dari BSLT dianalisis dengan menghitung persentase mortalitas, yaitu perbandingan jumlah larva mati terhadap total larva. Nilai LC_{50} dihitung dengan mengonversi persentase kematian ke dalam nilai probit menggunakan tabel probit. (Sukmawati, 2019).

Persentasi kematian larva dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{\text{jumlah larva mati}}{\text{jumlah larva awal}} \times 100\%$$

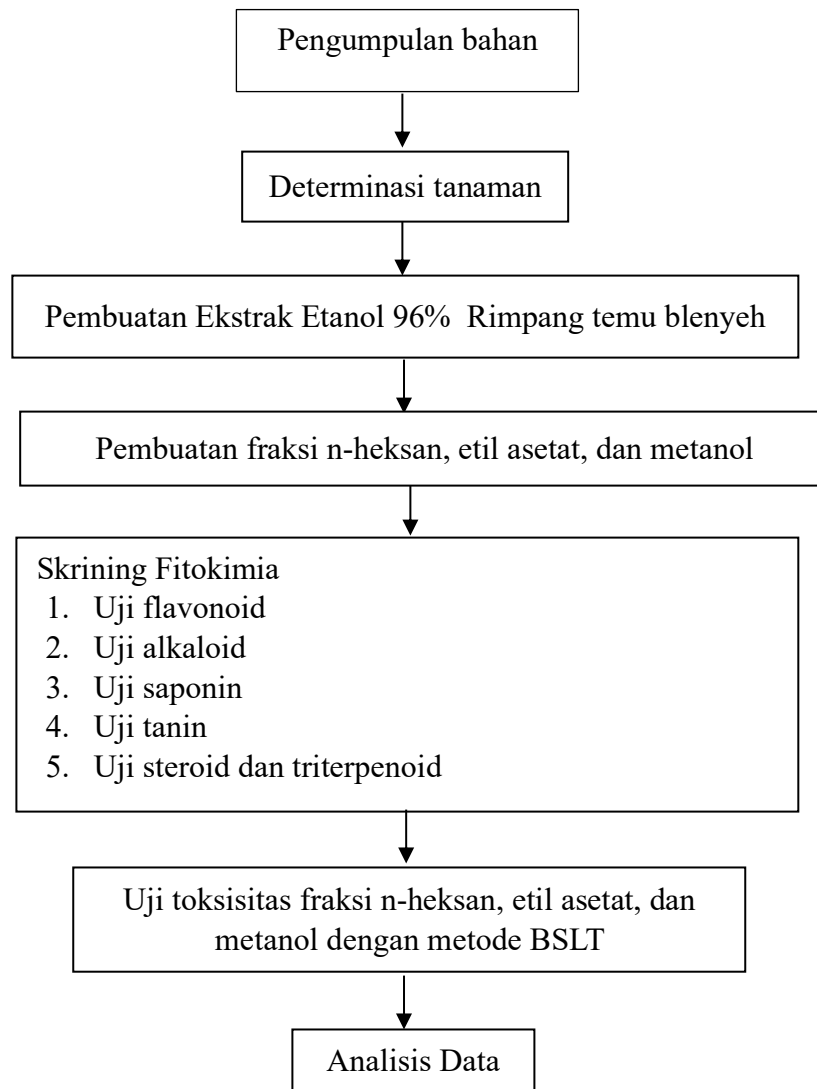
(Meyer *et al*, 1982).

3.5 Analisis Data

Dalam penelitian toksisitas fraksi rimpang temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Blume) menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), analisis dilakukan dengan mencatat jumlah larva udang yang mati dan menghitung tingkat kematiannya. Setelah data kematian terkumpul, nilai LC_{50} dihitung melalui metode regresi probit. Regresi probit dipilih karena merupakan

metode yang sering digunakan untuk memperkirakan dosis atau konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% dari hewan uji (LC_{50}/LD_{50}). Penggunaan metode ini didasarkan pada kemampuannya untuk memberikan prediksi dosis atau konsentrasi dengan variasi tingkat kematian yang luas, serta kemampuannya dalam memperkirakan waktu kematian hewan uji selama paparan hingga 96 jam, untuk menguji perbedaan antar kelompok, uji Anova dilakukan menggunakan program SPSS versi 29 (Wijaya dkk, 2018).

3.6 Bagan Alir Penelitian



Bagan 3.1. Alur Penelitian